

Федеральное государственное автономное учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

на правах рукописи

Рахматуллин Ильфат Зуфарович

**ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ И ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНАЯ
ПОДВИЖНОСТЬ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ (ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРИДОКСИНА, СТАТИНЫ)
ПО ДАННЫМ МЕТОДОВ ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ**

01.04.07 – физика конденсированного состояния

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Казань – 2015

Работа выполнена в научной лаборатории ЯМР спектроскопии Института физики Казанского (Приволжского) федерального университета

Научный руководитель: **Клочков Владимир Васильевич**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Анисимов Александр Васильевич**
доктор физико-математических наук,
профессор, заведующий лабораторией
биофизики транспортных процессов
Казанского института биохимии и
биофизики КазНЦ РАН

Волков Виталий Иванович
доктор физико-математических наук,
профессор, заведующий лабораторией
ядерного магнитного резонанса
Института проблем химической физики
РАН

Ведущая организация: Санкт-Петербургский государственный
университет, г. Санкт-Петербург

Защита состоится «25» февраля 2016 года в 15:10 на заседании диссертационного совета Д 212.081.15 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте Казанского (Приволжского) федерального университета <http://www.kpfu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук,
профессор



Еремин М.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Важнейшим этапом исследований в области физики конденсированного состояния, химической и биологической физике является установление трехмерной структуры органических или биоорганических соединений. Изучение пространственного строения органических соединений в растворах основаны как на использовании данных одномерной спектроскопии ЯМР (^1H , ^{13}C), включая динамический ЯМР, так и на использовании двумерной спектроскопии ЯМР NOESY (^1H - ^1H) (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). С помощью динамического ЯМР, включающего в себя анализ температурных изменений спектральных параметров и формы линии сигналов ЯМР, можно получать информацию о константах равновесия и константах скорости переходов между различными устойчивыми состояниями структурно-нежестких молекул. Спектроскопия ЯМР NOESY (^1H - ^1H) позволяет регистрировать ядерные эффекты Оверхаузера между ядрами и определять расстояния между ними в молекуле. В целом, современные ЯМР методы исследования позволяют получить уникальную информацию о конформационных свойствах, конформационной динамике молекул и пространственном строении молекулярных комплексов исследуемых объектов и подойти вплотную к выявлению закономерностей «структура – биологическая активность».

Производные пиридоксина и статины являются важными соединениями для кроветворных процессов. Пиридоксин принимает участие в производстве кровяных клеток (эритроцитов) и содержащегося в них красящего пигмента – гемоглобина, а также способствует равномерному снабжению клеток глюкозой [1]. Статины, основной функцией которых является снижение концентрации холестерина в крови [2], в последнее время привлекают внимание своими плеiotропными (липиднезависимыми) действиями [3]. Еще одно важное обстоятельство, объединяющее исследуемые вещества, связано с мишенью действия статинов – холестерином, поскольку его структура похожа на структуру витаминов.

В настоящее время в Казанском федеральном университете активно ведутся исследования, посвященные созданию новых лекарственных соединений, в частности, на основе производных пиридоксина и изучению биологических свойств уже известных препаратов (статинов). Неотъемлемой частью этих работ является изучение механизмов взаимодействия лекарственных препаратов с их биологическими мишенями, что невозможно без информации о пространственной структуре исследуемых соединений и их конформационном составе. Данная работа является составной частью этих исследований по созданию новых лекарственных препаратов.

Целью диссертационной работы являлось изучение пространственного строения и внутримолекулярной подвижности производных пиридоксина и молекулярных комплексов статины - модели клеточной мембраны. Для достижения поставленной цели решались **следующие задачи:**

1. Определение основных конформаций производных пиридоксина в растворах органических растворителей в широком диапазоне температур (173 К – 293 К) методами одно- и двумерной спектроскопии ЯМР.
2. Определение термодинамических параметров, характеризующих как конформационное равновесие (разность свободных энергий ΔG_0), так и переходы между конформерами (свободная энергия ΔG^\ddagger активации) в производных пиридоксина методом динамического ЯМР.
3. Исследование комплексообразования статинов с мицеллами и бицеллами на основе поверхностно-активных веществ и установление пространственного строения молекулярных комплексов статины - модели клеточной мембраны в растворе методами одно- и двумерной спектроскопии ЯМР.

В качестве **объектов исследования** были выбраны ранее не изученные производные пиридоксина: 9-(2,4-динитрофенилокси)-8-метил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридин (**I**), 9-(2,4-динитрофенилокси)-3,8-диметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридин (**II**), 9-(2,4-динитрофенилокси)-3-(изопропил)-8-метил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридин (**III**), 9-(2,4-динитрофенилокси)-3-(третбутил)-8-метил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридин (**IV**), 9-(2,4-динитрофенилокси)-3,3,8-триметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридин (**V**), 9-(2,4-динитрофенилокси)-3,8-диметил-3-пентил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридин (**VI**), а также лекарственные препараты: правастатин (**VII**) и симвастатин (**VIII**) (рис. 1). В качестве моделей заряженной поверхности биологической мембраны в работе были использованы мицеллы на основе додецилсульфата натрия (ДСН) и бицеллы на основе смеси димиристоил фосфатидилхолина (ДМФХ) и дигексаноил фосфатидилглицерола (ДГФГ).

Методы исследования. При решении поставленных задач были использованы методы спектроскопии ЯМР высокого разрешения: одномерная ЯМР спектроскопия на ядрах ^1H и ^{13}C , динамическая ЯМР спектроскопия на ядрах ^1H , двумерные гомоядерные и гетероядерные корреляционные ЯМР эксперименты (COSY, HSQC, HMBC), двумерная ЯМР NOESY спектроскопия. Эксперименты проводились с использованием ЯМР спектрометра «AVANCE II-500» фирмы «Bruker» (рабочие частоты: 500 МГц на ядрах ^1H и 125 МГц на ядрах ^{13}C). Квантово-химические расчеты относительных энергий предполагаемых (наиболее вероятных) конформаций в производных пиридоксина выполнялись в компьютерной программе HyperChem (ab initio, базис STO-3G), анализ полной формы линии – WinDNMR-Pro 7.1.14, математическая обработка экспериментальных данных – Origin Pro 7.5, моделирование пространственной структуры статинов методами молекулярной механики – ChemBio3D Ultra 12.0.

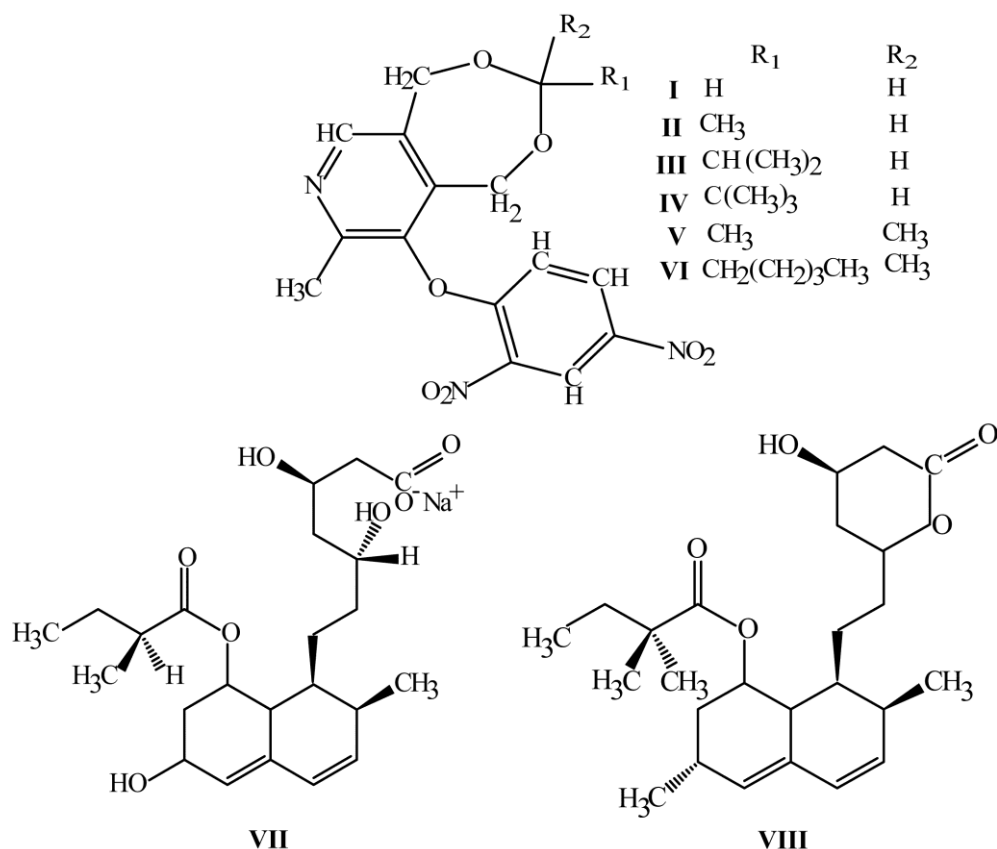


Рис. 1. Структурные формулы объектов исследования: производные пиридоксина (I-VI), правастатин (VII), симвастатин (VIII).

На защиту выносятся положения, сформулированные в выводах.

Научная новизна:

1. Впервые для ряда ранее не изученных производных пиридоксина определена структура компонентов конформационного обмена в растворе и проведен анализ спектров ЯМР (химические сдвиги, константы спин-спиновой взаимодействия).
2. Определены термодинамические параметры заторможенного вращения динитрофенильного фрагмента вокруг связи «пиридин-кислород» и конформационного обмена *кресло-твист* и *твист-твист* семичленного цикла в производных пиридоксина.
3. Впервые наблюдалось комплексообразование статинов с мицеллами и бицеллами на основе поверхностно-активных веществ и установлено пространственное строение молекулярных комплексов статины - модели клеточной мембраны в растворе методом двумерной ЯМР NOESY (¹H-¹H) спектроскопии.

Обоснованность и достоверность результатов подтверждается: согласием с результатами структурных исследований данного класса соединений, полученными с помощью других физических методов (рентгеноструктурный анализ), отсутствием противоречия с механизмами взаимодействия, присущими родственным биологическим системам, согласием с результатами квантово-механических расчетов энергетических барьеров, а

также использованием современного ЯМР оборудования и программного обеспечения ЯМР экспериментов.

Научная и практическая ценность:

1. Спектральные ЯМР характеристики, конформации компонентов обмена и активационные параметры, характеризующие конформационный обмен в производных пиридоксина могут быть использованы при исследовании более сложных соединений, содержащих схожие структурные фрагменты.
2. Информация о конформациях производных пиридоксина может быть использована при исследованиях связи «структура – биологическая активность» данного типа соединений.
3. Знание механизмов взаимодействия правастатина и симвастатина с моделями клеточной мембраны может способствовать более глубокому пониманию биологического действия гиполипидемических препаратов, и последующего их усовершенствования.

Личный вклад автора.

1. Участие в постановке цели и задач исследования.
2. Проведение ЯМР экспериментов, обработка, анализ и интерпретация полученных экспериментальных результатов.
3. Написание статей.

Апробация работы. Основные результаты докладывались и обсуждались на следующих научных школах и конференциях: международный симпозиум «Биохимия – основа наук о жизни» (г. Казань, 2013); республиканский конкурс научных работ среди обучающихся на соискание премии им. Н.И.Лобачевского (г. Казань, 2014); XXI всероссийская конференция «Структура и динамика молекулярных систем, Яльчик-2014» (г. Йошкар-Ола, 2014); XVII международная молодежная научная школа «Актуальные проблемы магнитного резонанса и его приложений» (г. Казань, 2014); 11-ая зимняя молодежная школа-конференция Spinus «Магнитный резонанс и его приложения» (г. Санкт-Петербург, 2014); итоговая конференция института физики Казанского (Приволжского) федерального университета (г. Казань, 2015), VI всероссийская конференция «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях» (г. Казань, 2015).

Диссертационная работа выполнена в научной лаборатории ЯМР спектроскопии Института физики Казанского (Приволжского) федерального университета. Работа на отдельных этапах поддерживалась грантами Министерства образования и науки РФ (16.552.11.7083; К(П)ФУ, 2.2792.2011), а также средствами субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Изучаемые в работе соединения производных пиридоксина синтезированы в лаборатории отдела медицинской химии НОЦ фармацевтики К(П)ФУ под руководством к.х.н., доцента Штырлина Ю.Г. Соединения

правастатина и симвастатина, также как и ДСН, ДМФХ, ДГФГ были приобретены в компании «Sigma-Aldrich».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, 8 – тезисы докладов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка публикаций автора, списка литературы из 112 наименований. Работа изложена на 128 страницах, содержит 57 рисунков и 16 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель, приведены методы и объекты исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, представлены выносимые на защиту научные положения.

В **первой главе** изложены положения классической и квантово-механической теории динамического ЯМР. Приводится уравнение, лежащее в основе компьютерных программ по анализу формы линии ЯМР. Также в первой главе приводятся уравнения для расчета активационных параметров конформационных процессов, кинетические характеристики которых определялись методом анализа формы линии ЯМР.

Описаны основы двумерной спектроскопии ЯМР NOESY, а также подробно рассмотрена методика расчета межпротонных расстояний в органических молекулах, приводится описание экспериментальной части диссертационной работы.

Вторая глава содержит описание исследуемых в работе объектов - производных пиридоксина и статинов (рис. 1).

В качестве моделей для приложения метода ЯМР были выбраны ацетали и кетали витамина В₆ (пиридоксина). Семичленные гетероциклы пиридоксина являются интересными объектами для ЯМР исследований благодаря широкому диапазону различных структурных видов этих молекул.

Семичленные циклические ацетали и кетали с плоскими фрагментами существуют в растворе в динамическом равновесии двух основных форм: *кресло* и *твист*. Ранее проведенные исследования выявили некоторые корреляции между стерической структурой и реакционной способностью этих соединений [4].

Соединения (**I-VI**) являются производными пиридина, содержащими семичленный ацетальный цикл и 2,4-динитрофенильный заместитель в орто положении (рис. 1). Такая конфигурация молекулы предоставляет удобную возможность для изучения влияния вращения вокруг связи «пиридин-кислород» на конформацию ацетального и кетального кольца, которое само принимает участие в быстром конформационном обмене между различными формами при комнатной температуре [5].

Таким образом, исследуемые соединения представляют собой циклические молекулы с несколькими типами внутримолекулярных движений

при комнатной температуре. Это обстоятельство усложняет изучение конформационных особенностей данных молекул и, следовательно, предсказание и объяснение их биохимических и физических свойств.

Статины – это условное название группы лекарственных препаратов, предназначенных для снижения концентрации холестерина в крови человека. Статины (в частности, правастатин (**VII**) и симвастатин (**VIII**) (рис. 1)), по сравнению с другими гиполипидемическими препаратами, обладают наиболее выраженным гипохолестеринемическим действием.

При изучении данных соединений необходимо помнить важное обстоятельство о том, что эффективность, метаболизм и безопасность статинов зависит от их расположения на молекулярной мембране [6].

Одними из широко используемых моделей мембран в ЯМР работах являются мицеллы додецилсульфата натрия (ДСН) и бицеллы на основе димиристоил фосфатидилхолина (ДМФХ) и дигексаноил фосфатидилглицерола (ДГФГ). Головочные группы молекул ДСН и ДМФХ/ДГФГ в мицеллах и бицеллах имитируют поверхность биологической мембраны.

В **третьей главе** приводится литературный обзор конформационной структуры схожих с исследуемыми в данной работе циклических систем, ранее изученных методом ЯМР и описываются результаты исследования конформаций производных пиридоксина: ацетальные (**I-IV**) и кетальные (**V,VI**) соединения (рис. 1).

Для каждого соединения приводятся спектры ^1H ЯМР при различных температурах и таблицы с параметрами сигналов. Для примера на рис. 2 представлены ^1H ЯМР спектры при различных температурах для соединения **II**.

Химическая структура соединения **II** была установлена на основе совокупного анализа результатов одномерных ^1H и ^{13}C и двумерных ЯМР экспериментов. Сигналы в ^1H ЯМР спектре (рис. 3) были отнесены с использованием двумерных ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC и NOESY ЯМР спектров при комнатной (298 K) и низкой (203 K) температурах.

Эксперименты с изменением температуры раствора демонстрируют, что исследуемое соединение участвует в процессе конформационного обмена. Для того чтобы получить энергетические параметры и определить тип наблюдаемого процесса конформационного обмена были выполнены эксперименты с понижением температуры.

При понижении температуры форма линии сигналов в ^1H ЯМР спектре соединения **II** также изменяется (рис. 2а). Сигналы протонов CH_2 -7 сначала уширяются, затем наблюдается их коалесценция и, затем распадаются на два АВ-квадруплета. Для сигналов CH_2 -4 также наблюдается подобная эволюция формы линии, но, в этом случае, разность между химическими сдвигами сигналов геминальных протонов меньше, чем для сигнала CH_2 -7. Форма линии других сигналов также изменяется с вариацией температуры, так что количество сигналов в ^1H ЯМР спектре соединения **II** при температуре 203 K удваивается по сравнению со спектром ^1H ЯМР при комнатной температуре.

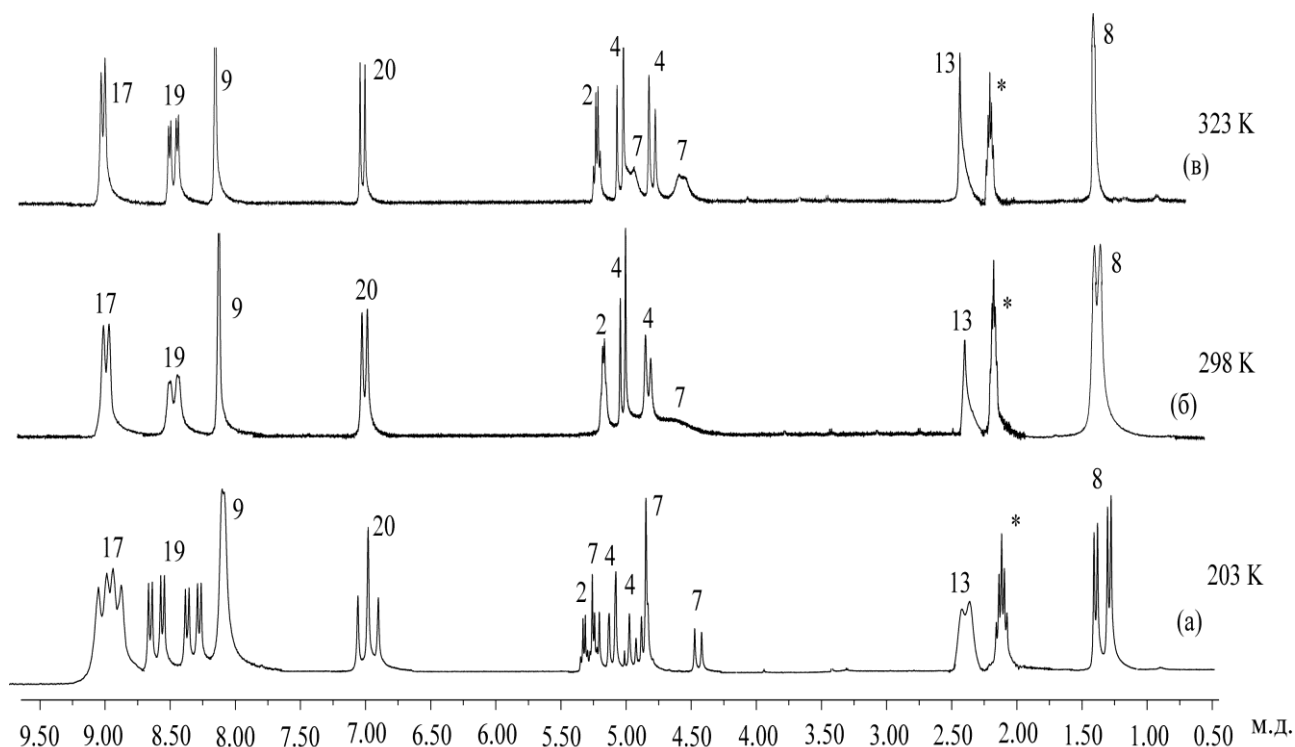


Рис. 2. ^1H ЯМР спектр соединения **II**, растворенного в ацетоне- d_6 при температурах 203 К (а), 298 К (б) и 323 К (в), * - сигнал растворителя.

Анализ интегральных интенсивностей сигналов, относящихся к различным конформациям, показал, что последние присутствуют в растворе в соотношении 1.00 : 1.06. Разность между свободными энергиями Гиббса двух конформеров ΔG_0 вычислялась по формуле:

$$\Delta G_0 = -RT \ln (P_1 / P_2),$$

где R – универсальная газовая постоянная, T – температура в градусах Кельвина (К), P_1 и P_2 - доли соответствующих конформеров.

Для того чтобы определить активационные параметры конформационных переходов был проведен анализ формы линии сигналов ЯМР при различных температурах. Изменение различных конформационных соотношений с вариацией температуры контролировалось на основе определенных значений ΔG_0 при предположении, что $\Delta S = 0$.

На рис. 3 показано сравнение экспериментального и теоретического фрагментов спектра (сигнал от СН-19) при различных температурах.

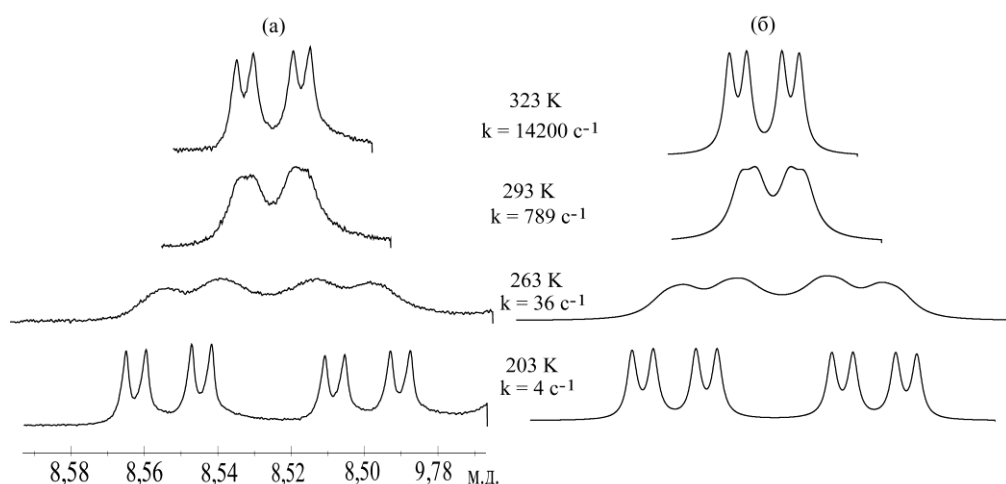
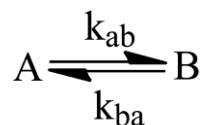


Рис. 3. Форма линии сигналов ^1H ЯМР протона СН-19 соединения **II** и константы скорости обмена при различных температурах: (а) экспериментальный ^1H ЯМР спектр; (б) рассчитанный ^1H ЯМР спектр.

Для анализа полной формы линии была использована программа WinDNMR-Pro 7.1.14. Расчет константы скорости (k) проводился путем сравнения экспериментальной и рассчитанной форм сигналов ЯМР с использованием известных соотношений:



$$P_1 \cdot k_{ab} = P_2 \cdot k_{ba}; P_1 + P_2 = 1,$$

где P_1 и P_2 - доли соответствующих конформеров конформаций А и В в результирующем сигнале ЯМР.

Активационные параметры были рассчитаны с использованием уравнения Эйринга. Ошибки в определении активационных параметров ΔG^\ddagger не более чем 1 кДж/моль.

Свободные активационные энергии обратимых реакций первого порядка, которые включают внутримолекулярные процессы вращения и взаимные превращения циклических систем, могут быть найдены с использованием следующих уравнений:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger;$$

$$\ln(k/T) = -\Delta H^\ddagger / RT + \Delta S^\ddagger / R + 23.76$$

где ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger - активационная энтальпия и энтропия соответственно, T – температура в градусах Кельвина (K), R – универсальная газовая постоянная.

Аналогичные исследования проведены для соединений **I**, **III-IV**. Рассмотрение низкотемпературных спектров ЯМР как для соединения **II**, так и для соединений **III-IV** однозначно позволяет утверждать, что при низкой температуре в ЯМР спектрах для этих соединений наблюдаются конформеры вращения динитрофенильного фрагмента вокруг С-О связи.

В таблице 1 представлены параметры, характеризующие как конформационное равновесие (ΔG_0), так и переходы между конформерами

(ΔG^\ddagger) вращения динитрофенильного фрагмента вокруг С-О связи в производных пиридоксина, полученные методом динамического ЯМР.

Таблица 1. Активационные параметры вращения динитрофенильного фрагмента вокруг С-О связи для соединений **I-IV**. Ошибка в определении ΔG^\ddagger составляла не более 1 кДж/моль. ΔG_0 – разности свободных энергий двух конформеров вращения, ошибка в определении ΔG_0 – 0.01 кДж/моль.

№ соед.	I R: H	II R: CH ₃			III R: CH(CH ₃) ₂		IV R: C(CH ₃) ₃
Анализ. сигнал	CH ₂ -2,4,7	CH-19	CH ₃ -8	CH ₂ -4,7	CH-20	CH-19	CH-19
ΔG^\ddagger_{203K} , кДж/моль	52.8	51.0	51.1	51.0	50.9	50.9	50.1
P ₁ / P ₂	-	1.00 / 1.06			1.00 / 1.14		1.00 / 1.66
ΔG_0 кДж/моль	-	0.1			0.2		0.9

Исследуемые соединения представляют собой семичленный ацетальный цикл и 2,4-динитрофенильный заместитель. Следовательно, существует два конформационных процесса, которые могут быть определены методом динамической спектроскопии ЯМР (рис. 4). Первый процесс – заторможенное вращение вокруг связи «пиридин-кислород». Второй процесс – конформационное взаимопревращение семичленного ацетального кольца.

Имеется восемь возможных конформаций для соединения **I** (R_a/S_a ориентации эфирного остатка, P/M *твист* конформации и P/M *кресло* конформации), которые приводят к четырем парам энантиомеров – R_a,P -*твист*/ S_a,M -*твист*; S_a,P -*твист*/ R_a,M -*твист*; R_a,P -*кресло*/ S_a,M -*кресло* и S_a,P -*кресло*/ R_a,M -*кресло*. Появление хирального атома в соединениях **II-IV** приводит к следующим шести парам энантиомеров (в этом случае разрешена только одна *кресло* конформация, которая зависит от конфигурации хирального атома): R,R_a,P -*твист*/ S,S_a,M -*твист*; R,S_a,P -*твист*/ S,R_a,M -*твист*; S,R_a,P -*твист*/ R,S_a,M -*твист*; S,S_a,P -*твист*/ R,R_a,M -*твист*; R,R_a -*кресло*/ S,S_a -*кресло*; R,S_a -*кресло*/ S,R_a -*кресло*.

Из литературы известно, что конформационное равновесие *кресло-твист* зависит от размера заместителя при ацетальном атоме углерода, и соединения с объемными заместителями, такие как трет-бутил, имеют форму *кресло*. В случае менее объемных заместителей (Me, i-Pr), доля *твист* конформации в цикле возрастает, а формы *кресло* и *твист* участвуют в быстром обмене.

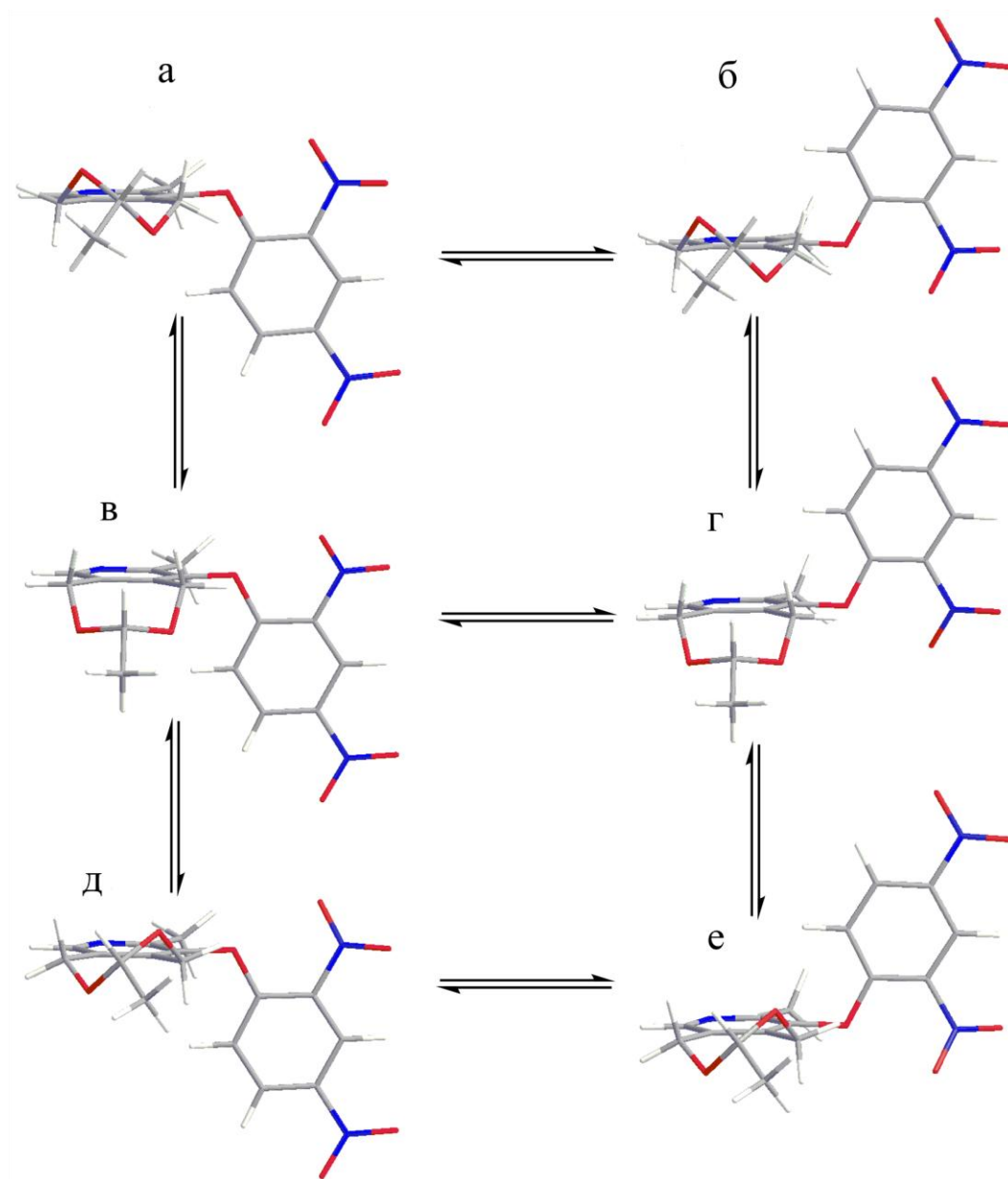


Рис. 4. Схема конформационных переходов для соединения **II**. Конформации: а) RR_aM -*twist*; б) RS_aM -*twist*; в) RR_a -*кресло*; г) RS_a -*кресло*; д) RR_aP -*twist*; е) RS_aP -*twist*.

Эффект второго процесса можно заметить на ЯМР спектре при температурах от 257 К до 203 К. При смене температуры раствора происходит изменение таких спектральных параметров, как химический сдвиг (δ) и неэквивалентность ($\Delta\nu$) сигналов геминальных протонов CH_2 -4, соответствующих АВ-системе.

Семичленная циклическая часть рассматриваемых соединений может быть представлена в растворе в двух равновесных состояниях: *кресло* и *twist* с соответствующими долями P_k и P_m . В качестве параметра рассматривается неэквивалентность $\Delta\nu$ сигналов геминальных протонов CH_2 -4. Зависимость $\Delta\nu$ от температуры для соединений **II**, **III** и **IV** показана на рис. 5.

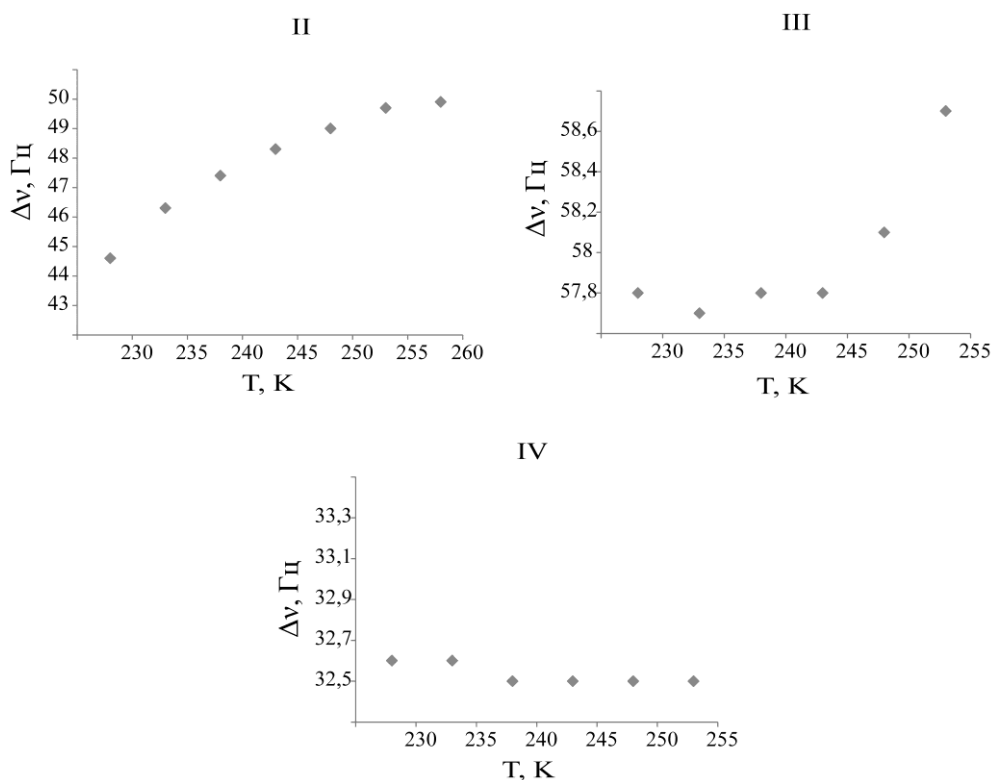


Рис. 5. Зависимость неэквивалентности $\Delta\nu$ протонов сигнала $\text{CH}_2\text{-4}$ от температуры для соединений **II**, **III** и **IV**.

Как видно из рис. 5, температурные изменения не оказывают влияние на значение неэквивалентности $\Delta\nu$ от протонов сигнала $\text{CH}_2\text{-4}$ соединения **IV**. Следовательно, это подтверждает «жесткую» *кресло* конформацию его семичленного цикла. Напротив, $\Delta\nu$ от того же самого сигнала соединений **II** и **III** сильно зависит от температуры, означая изменение в конформационном равновесии между формами *кресло* и *твист*.

Для кетальных соединений **V** и **VI** также были проведены ЯМР эксперименты при вариации температуры растворов и проведен анализ формы линии ЯМР спектров при различных температурах (рис. 6). Однако, оценить активационный барьер по анализу полной формы линии для сигналов $\text{CH}_2\text{-4,7}$ не удалось, поскольку зависимость $\ln(k/T)$ от $1/T$ имеет нелинейный характер (рис. 7). Такое отклонение от линейной зависимости в координатах $\ln(k/T)$ от $1/T$ происходит из-за подключения еще одного дополнительного процесса. Первый процесс – это взаимопревращения семичленного цикла между энантиомерными *P*- и *M*-*твист* конформациями. Этот процесс “вымораживается” в первую очередь. Замедление первого процесса приводит к формированию двух конформационных энантиомеров за счет спирального элемента хиральности. Затем замедляется второй процесс, связанный с вращением динитрофенильного фрагмента вокруг C-O связи. Он приводит к конформационным энантиомерам из-за осевой хиральности (рис. 8).

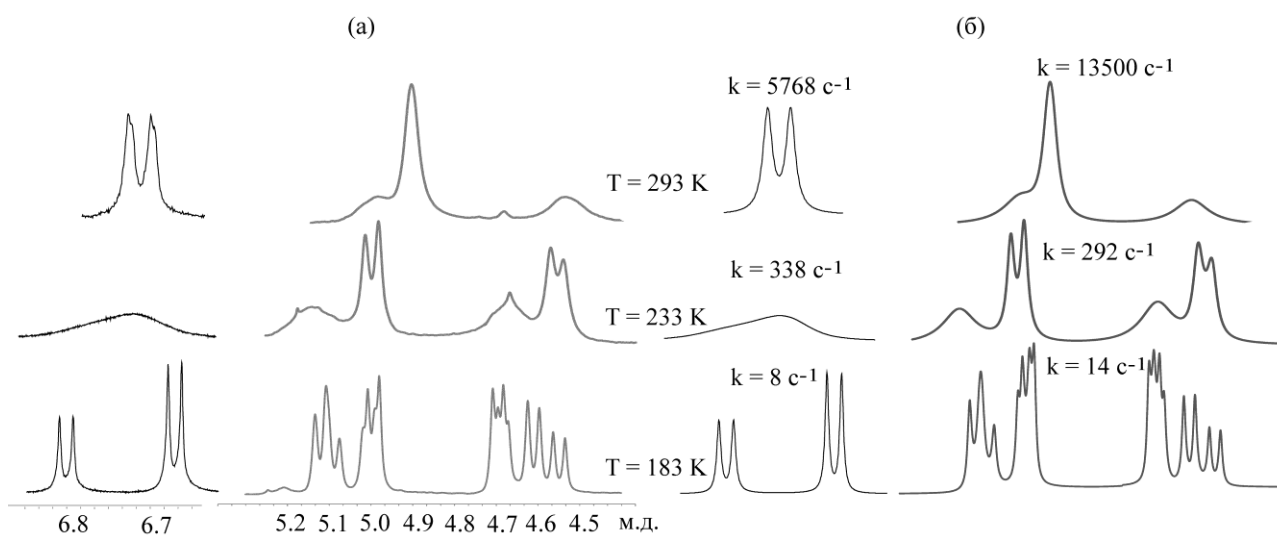


Рис. 6. Форма линии сигналов ^1H ЯМР протонов CH-20 и CH₂-4,7 соединения **V** и константы скорости обмена при различных температурах: (а) экспериментальный ^1H ЯМР спектр; (б) рассчитанный ^1H ЯМР спектр.

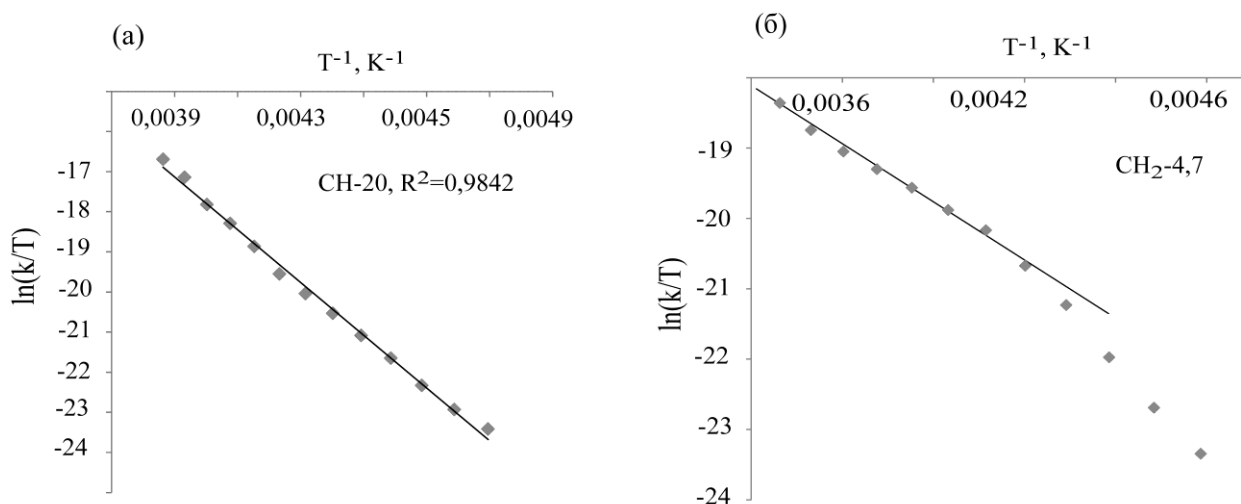


Рис. 7. Зависимости константы скорости обмена от температуры в соединении **V**: для группы CH-20(а); для групп CH₂-4,7(б).

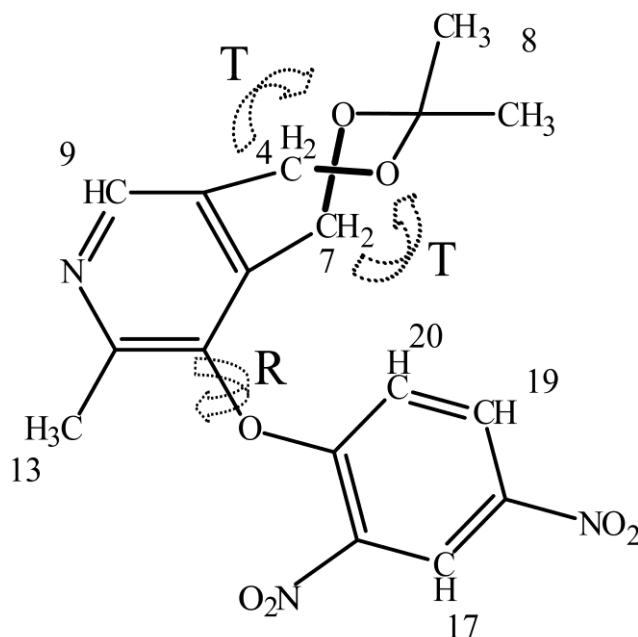


Рис. 8. Внутримолекулярные динамические процессы в соединениях **V** и **VI** (на примере соединения **V**): вращение динитрофенильного фрагмента вокруг С-О связи (R), *твист-твист* конформационные переходы семичленного цикла (Т).

Когда оба процесса “выморожены” в спектре ЯМР можно увидеть две пары конформационных диастереомеров в виде двух наборов сигналов от каждой функциональной группы.

Эти эффекты конформационного обмена для каждого сигнала выражены по-разному из-за различий в локализации протонных групп. Например, процесс вращения вокруг С-О связи оказывает большое влияние на изменение формы линии сигналов СН-20 и СН₃-13, в то время как процесс взаимопревращения семичленного цикла больше влияет на резонансные сигналы СН₂-4,7 и СН₃-8.

С понижением температуры, наблюдается характерная для кеталей спектральная картина. В первую очередь частично “вымораживаются” два АВ квадруплета. Затем, во временной шкале ЯМР замедляется второй процесс, который приводит диастереотопомеризации и, как результат, к удвоению набора сигналов.

Мы проанализировали зависимость константы скорости обмена от температуры для сигналов СН₂-4,7 с использованием программного обеспечения Origin 7.5 (корпорация OriginLab) путем математического разложения сложной двухкомпонентной экспоненциальной зависимости на две простые линейные зависимости согласно уравнению:

$$\frac{k}{T} = \frac{k_1}{T} + \frac{k_2}{T} = \frac{k_B}{h} * \exp\left(-\frac{\Delta G_1^\ddagger}{RT}\right) + \frac{k_B}{h} * \exp\left(-\frac{\Delta G_2^\ddagger}{RT}\right),$$

где k_1 и k_2 – константы скорости двух конформационных обменных процессов, при этом значения k_2 определялись нами из соответствующих зависимостей скоростей обмена от температуры для групп СН-20 или СН₃-13.

Таким образом, отдельно определены энергетические барьеры для каждого из процессов. Полученные энергетические характеристики конформационных процессов для соединения **V** приведены в таблице 2.

Соединение **VI** имеет несимметричный кетальный атом углерода, который значительно усложняет спектр ЯМР по сравнению с соединением **V**. Это приводит к тому, что количество сигналов при низкой температуре становится в четыре раза больше по сравнению со спектром при комнатной температуре. Энергетические барьеры конформационного обмена для соединения **VI**, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Активационные параметры конформационного обмена для соединений **V** и **VI**: R – вращение динитрофенильного фрагмента вокруг С-О связи, Т – *твист-твист* вариация геометрии семичленного цикла. Ошибка в определении ΔG^\ddagger составляла не более 1 кДж/моль.

Соед.	Сигналы ЯМР ^1H	ΔG^\ddagger_{203} , кДж/моль
V	CH-20	41.4 (R)
	CH ₃ -13	40.2 (R)
	CH ₂ -4,7	42.7 (R), 52.3 (T)
VI	CH-20	45.2 (R)
	CH-17	44.4 (R)
	CH-9	42.7 (R); 58.2 (T)

Как видно из таблицы 2, соединение **VI** также принимает участие в двух аналогичных конформационных процессах подобно соединению **V**. Значение барьера для процесса вращения динитрофенильного фрагмента вокруг С-О связи для соединения **VI** близко его значению для соединения **V**. Однако, активационные энергии для второго процесса конформационного обмена, вызванного взаимопревращением семичленного цикла между энантиомерными Р- и М- конформациями спирального типа (*твист*), различны. Большее значение ΔG^\ddagger_{203} для соединения **VI** можно объяснить большим размером метилпентильного заместителя по сравнению с диметильным для соединения **V**.

Для того чтобы определить какой из энергетических барьеров соответствует вращению динитрофенильного фрагмента, с помощью программы HyperChem 8 были сделаны расчеты РМЗ вращательных барьеров. Данные расчетов хорошо согласуются с данными динамического ЯМР для второго конформационного процесса. Это подтверждает, что вращение динитрофенильных групп затормаживается при более низких температурах, чем трансформация семичленного кетального кольца.

Таким образом, в изученных нами соединениях **I-VI** происходят интересные внутримолекулярные процессы, знание характеристик которых может помочь разобраться в молекулярной роли производных пиридоксина.

Четвертая глава посвящена исследованию пространственного строения комплексов правастатина и симвастатина (рис. 1) с моделями биологической мембраны: мицеллы додецилсульфата натрия (ДСН) и бицеллы на основе димиристоил фосфатидилхолина (ДМФХ) и дигексаноил фосфатидилглицерола (ДГФГ) (рис. 9).

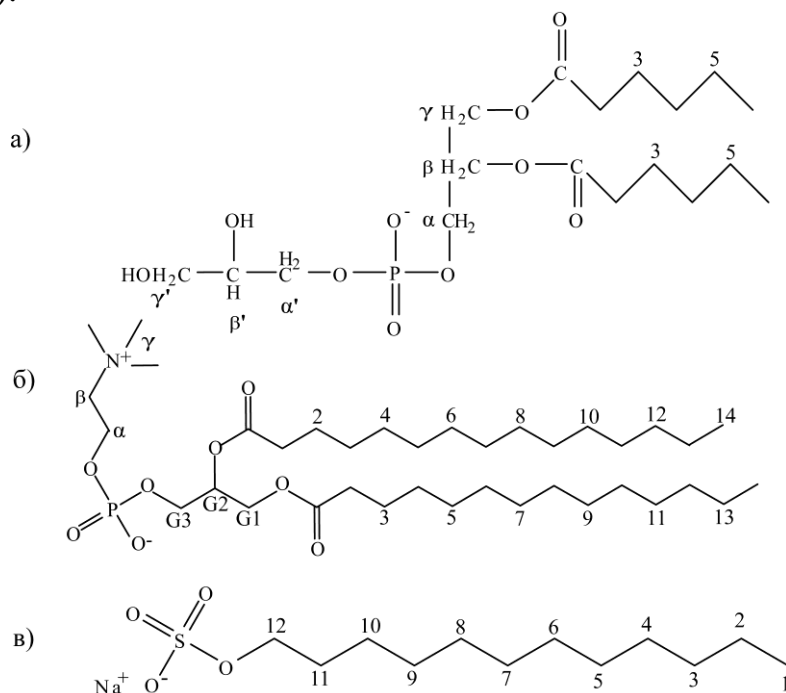


Рис. 9. Химические структуры:
1,2-дигексаноил-глицеро-3-фосфоглицерола (ДГФГ) (а);
1,2-димиристоил-глицеро-3-фосфохолина (ДМФХ) (б);
додецилсульфата натрия (ДСН) (в).

Механизм формирования комплекса между правастатином и мицеллами ДСН, были изучены с помощью экспериментов NOESY.

В двумерном ЯМР спектре NOESY (рис. 10) наблюдаются кросс-пики между сигналами протонов правастатина СН-1 и СН₂-2' и протонами СН₂О-12 головочных групп ДСН. Таким образом, можно заключить, что правастатин формирует межмолекулярный комплекс с мицеллами ДСН путем взаимодействия кислородных атомов правастатина с полярной головкой ДСН. Это означает, что правастатин располагается на полярной поверхности мицеллы, которая используется в качестве модели мембраны (рис. 13а).

Следующим шагом было изучение взаимодействия правастатина с бицеллами ДМФХ/ДГФГ. В спектре NOESY наблюдается множество кросс-пиков, образованных как в результате внутримолекулярных эффектов ЯЭО для молекул правастатина и ДМФХ/ДГФГ, так и межмолекулярных эффектов между данными молекулами (рис. 11). Наблюдение межмолекулярных кросс-пиков служит свидетельством формирования комплекса между молекулами правастатина и поверхностью бицелл: 6/γ^{ДГФГ}, G1^{ДМФХ}; β^{ДГФГ}, G2^{ДМФХ}/15; 15/4-13^{ДМФХ}; α',β^{ДМФХ}/13. Дополнительным доказательством формирования комплекса также служит наблюдение единого коэффициента диффузии

($D = -9.66 \text{ м}^2/\text{с}$) для молекул правастатина и ДМФХ/ДГФГ в спектре ЯМР DOSY.

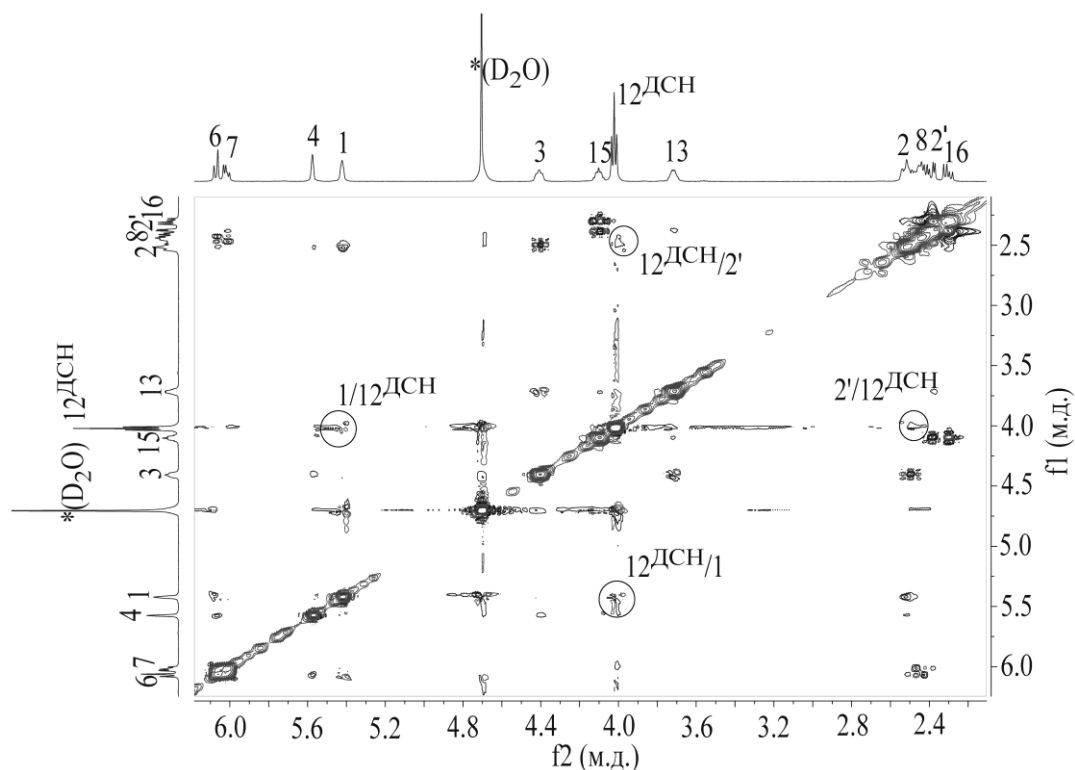


Рис. 10. Фрагмент двумерного ЯМР спектра NOESY правастатина+D₂O+ДСН при Т=303К. Время смешивания τ_м=50 мс.

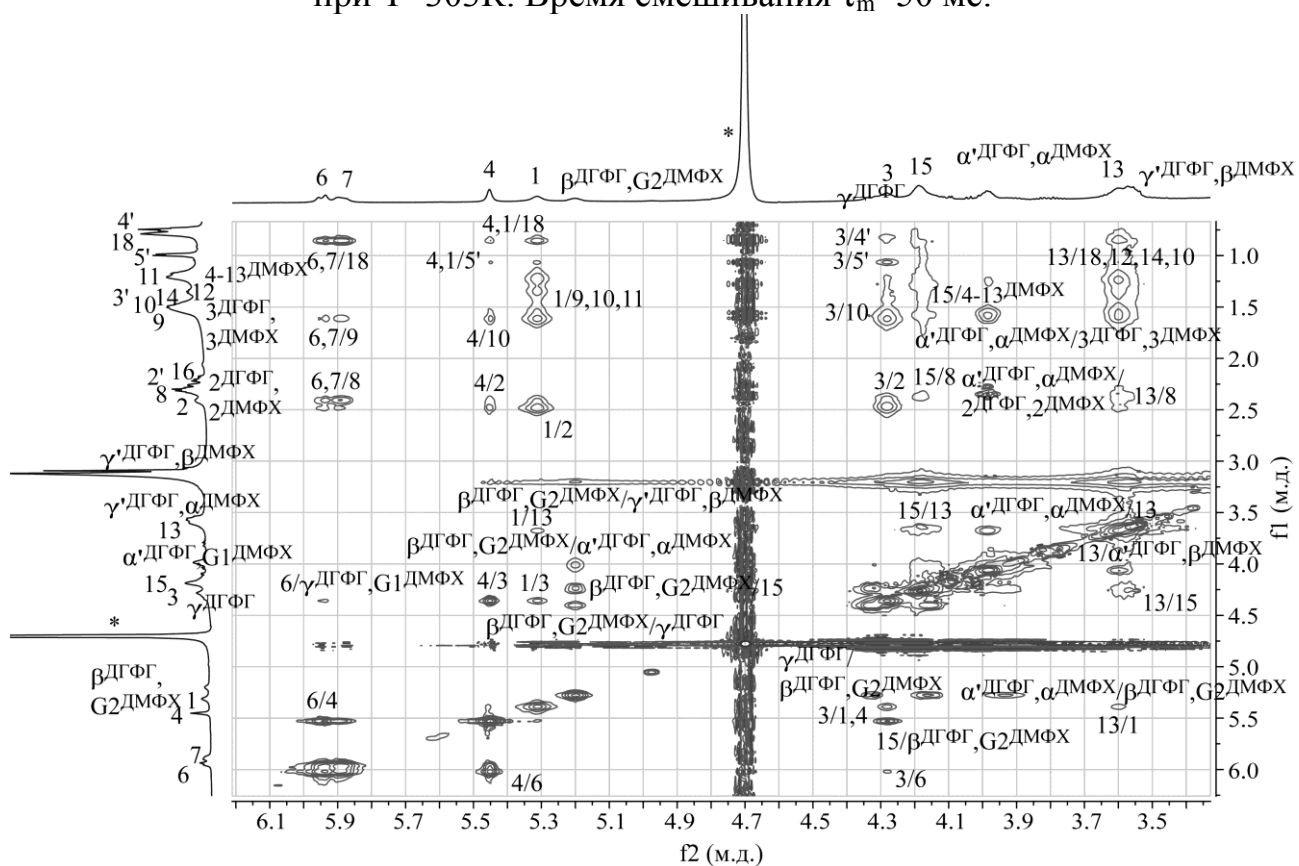


Рис. 11. Фрагмент ЯМР спектра 2D NOESY правастатина+ДМФХ/ДГФГ в D₂O при T=293K. Время смешивания $\tau_m = 100$ мс.

Для количественного описания структуры правастатина и симвастатина, а также его взаимодействия с модельными мембранами, были получены данные о межъядерных расстояниях в системах: правастатин+D₂O, правастатин+ДСН+D₂O, правастатин+ДМФХ/ДГФГ+D₂O, симвастатин+ДМСО, симвастатин+ДСН+D₂O, которые были рассчитаны по анализу наборов двумерных спектров NOESY при различных временах смешивания.

Добавление мицелл или бицелл к правастатину приводит к некоторым изменениям в конформации правастатина. Алифатические хвосты С-1' - С-4' и С-11 - С-17 сближаются друг к другу вследствие дополнительного взаимодействия с поверхностью мембранных миметиков. Это подтверждается наблюдением межмолекулярного ЯЭО: СН-1/СН₂-12^{ДСН} и СН-2'/СН₂-12^{ДСН} в растворе D₂O+ДСН и СН-13/СН₂-α,β^{ДМФХ}, СН₂-α'^{ДГФГ} в растворе D₂O+ДМФХ/ДГФГ. Кроме того, имеются некоторые различия в расстояниях для похожих групп правастатина, которые зависят, видимо, от вида модельной мембраны: СН-4...СН-6 (2.79 Å в бицеллах и 2.35 в мицеллах), СН-1...СН-3 (3.25 Å в бицеллах и 2.68 в мицеллах). Эти изменения могут быть объяснены переориентацией соответствующих протонов относительно цикла и относительно друг друга. Более того, между протонами алифатических цепей правастатина в присутствии мицеллы в 2D NOESY спектре наблюдается больше кросс-пиков, чем в том же спектре без мицелл. Таким образом, мы заключили, что связь правастатина с поверхностью модельной мембраны происходит посредством его гибких частей: частично отрицательно заряженные кислородные атомы взаимодействуют с ионом Na⁺ и с полярными "головочными" группами ДСН и ДМФХ/ДГФГ.

Второе важное соединение из этой серии – симвастатин, исследование которого проводилось по аналогии с вышеописанным исследованием правастатина. В ходе исследования правастатина с модельными мембранами (ДСН и ДМФХ/ДГФГ) не было выявлено сильных различий механизма комплексообразования от типа мембранного миметика. Поэтому, при исследовании взаимодействия симвастатина с модельными мембранами мы ограничились одним типом – мицеллами ДСН.

В спектрах наблюдаются кросс-пики между протонами СН-3, СН₂-4 групп симвастатина и "хвостовыми" протонами ДСН (рис. 12). Из данных ЯМР NOESY, следует, что симвастатин располагается внутри мицеллы (рис. 13б), что соответствует работе [6], где также говорится, что молекула симвастатина может встраиваться к внутреннему ядру липидного бислоя мембраны, примыкая к основной цепи глицерола.

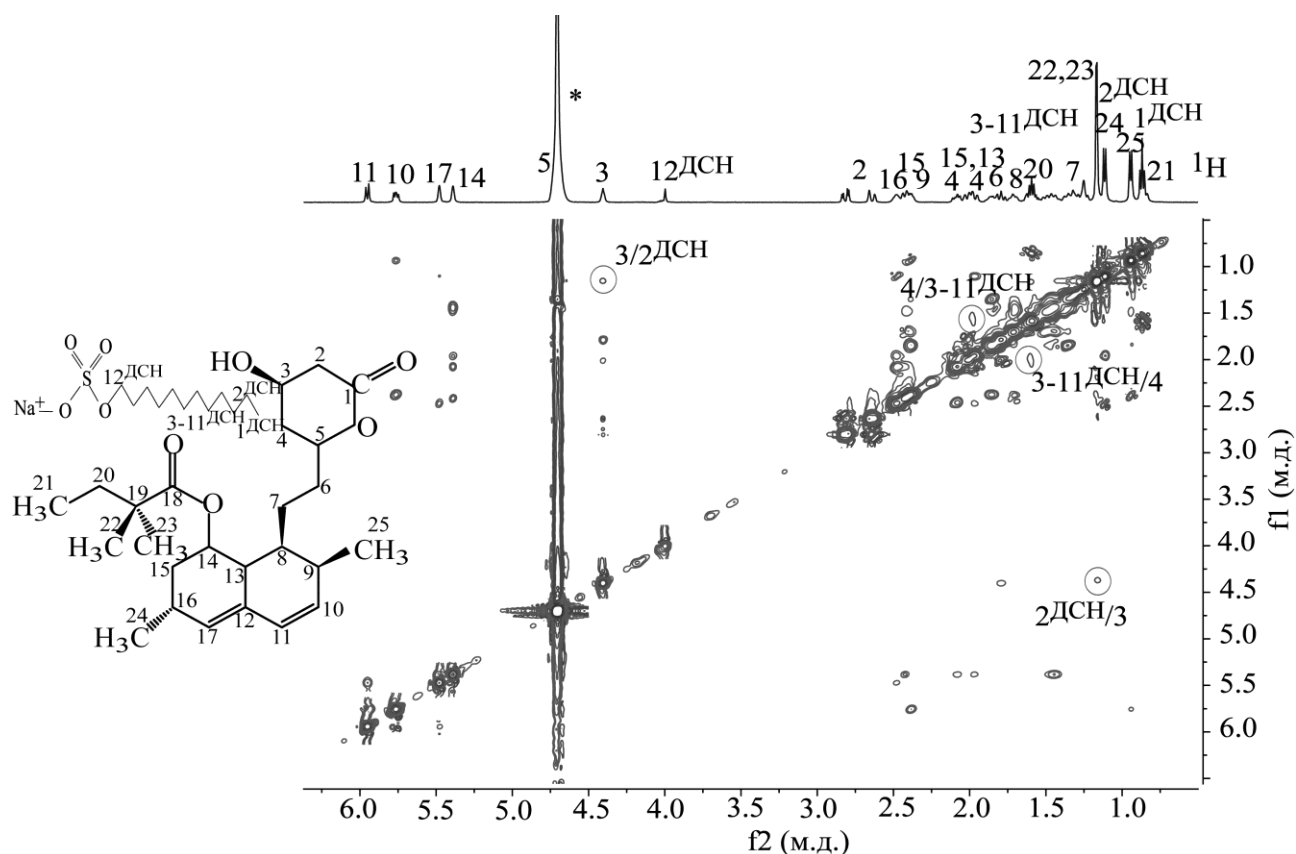


Рис. 12. Спектр ЯМР 2D NOESY симвастати́на+ДСН+D₂O при T=303K. Время смешивания $\tau_m=100$ мс.

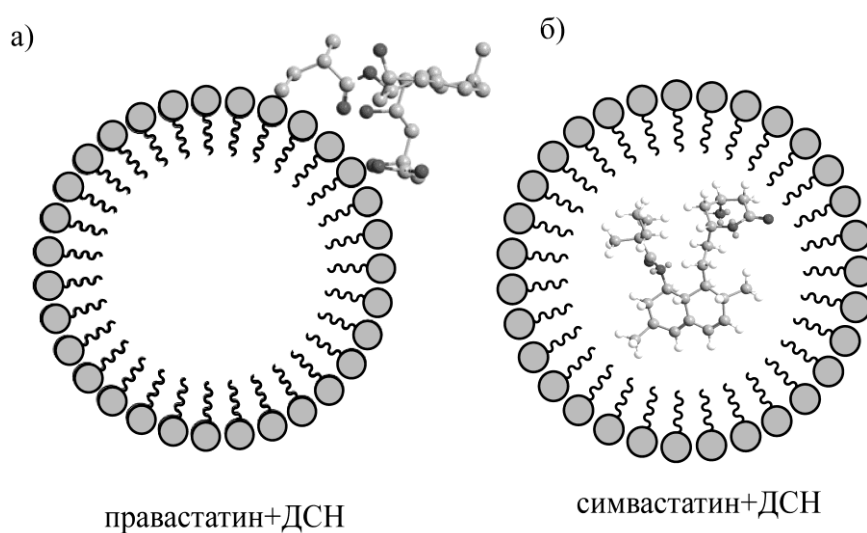


Рис. 13. Схематическое представление комплексов: правастатин+ДСН (а); симвастатин+ДСН (б).

Таким образом, различие в химической структуре статинов может приводить к большому отличию в природе их взаимодействия с моделями мембран. Эти различия могут помочь в объяснении некоторых различий в фармакологических свойствах данных соединений.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Совокупным анализом данных одномерной ЯМР (^1H , ^{13}C) спектроскопии, включая динамическую ЯМР спектроскопию, и двумерной гомоядерной (COSY, TOCSY), гетероядерной (^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC) и NOESY (^1H - ^1H) спектроскопии ЯМР с привлечением расчетного моделирования (HyperChem 8, ChemBio3D Ultra 12.0) получены следующие результаты:

1. Установлено, что метил- и изопропил замещенные производные пиридоксина в растворе (ацетон- d_6) существуют в состоянии динамического равновесия *кресло* – *твист* форм, а трет-бутил замещенной аналог - в «жесткой» конформации *кресло* [A1]; определены энергии активации ΔG^\ddagger *кресло-твист* взаимопревращений. Для диметил- и метил-пентил- замещенных пиридоксина в растворе реализуется динамическое равновесие между двумя *твист* формами; определены свободные энергии активации ΔG^\ddagger *твист-твист* взаимопревращений.
2. Впервые описан процесс заторможенного вращения динитрофенильного фрагмента вокруг связи «пиридин-кислород» в исследованных производных пиридоксина. Определены разности свободных энергий ΔG_0 двух конформеров вращения и свободные энергии активации ΔG^\ddagger заторможенного вращения. Показано, что для дизамещенных кетальных соединений пиридоксина барьеры заторможенного вращения динитрофенильного фрагмента вокруг C-O связи несколько ниже, чем для ацетальных соединений пиридоксина [A3].
3. Изучены особенности строения молекул правастатина и симвастатина в растворе и определены межпротонные расстояния в них. Установлено различие в формировании межмолекулярных комплексов правастатина с поверхностью модельных мембран (мицеллы ДСН и бицеллы ДМФХ/ДГФГ) и симвастатина с внутренним ядром мицеллы ДСН [A2].

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова О.И. Действие пиридоксина на кровь - Сб. науч. трудов / Московская ветеринарная академия. - 1973, Т.65 – С. 54-56.
2. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*. – 2010. V. 376. P. 1670–1681.
3. Фесенко Э.В. Плейотропные эффекты статинотерапии и их роль в преодолении проблемы полиморбидности / Э.В. Фесенко, К.И. Прощаев, В.И. Поляков // Современные проблемы науки и образования. – 2012, № 2.
4. Петухов А.С. Стереохимические трансформации некоторых семичленных диметильных кеталей пиридоксина / А.С. Петухов, А.Д. Стрельник, В.Ю. Федоренко, И.А. Литвинов, О.А. Лодочникова, Ю.Г. Штырлин, Е.Н. Климовицкий // Журнал общей химии. - 2007, 77, 8. – С. 1416-1421.
5. Аганов А.В. Новые аспекты приложения ЯМР для исследования процессов химического обмена / А.В. Аганов, В.В. Клочков, Ю.Ю. Самитов // Успехи химии. - 1985, 54, 10. – С. 1585 - 1612.
6. Mason R.P. Intermolecular differences of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors contribute to distinct pharmacologic and pleiotropic actions / R.P. Mason, M.F. Walter, Ch.A. Day, R.F.Jacob // *The American journal of cardiology* – 2005, 96. – P. 11F-23F.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- A1. **Rakhmatullin, I.Z.** Dynamic NMR study of cyclic derivatives of pyridoxine / I.Z. Rakhmatullin, L.F. Galiullina, M.R. Garipov, A.D. Strel'nik, Y.G. Shtyrlin, V.V. Klochkov // *Magnetic Resonance in Chemistry* – 2014 – Vol. 52, I. 12, P. 769-778.
- A2. Galiullina, L.F. Structure of pravastatin and its complex with sodium dodecyl sulfate micelles studied by NMR spectroscopy / L.F. Galiullina, **I.Z. Rakhmatullin**, E.A. Klochkova, A.V. Aganov, V.V. Klochkov // *Magnetic Resonance in Chemistry* – 2015 – Vol. 53, I. 2, P. 110-114.
- A3. **Rakhmatullin, I.Z.** Dynamic NMR study of dinitrophenyl derivatives of seven-membered cyclic ketals of pyridoxine / I.Z. Rakhmatullin, L.F. Galiullina, M.R. Garipov, A.D. Strel'nik, Y.G. Shtyrlin, V.V. Klochkov // *Magnetic Resonance in Chemistry* – 2015 – Vol. 53, I. 10, P. 805-812.
- A4. **Rakhmatullin, I.Z.** Structural studies of pravastatin and simvastatin and their complexes with SDS micelles by NMR spectroscopy / I.Z. Rakhmatullin, L.F. Galiullina, E.A. Klochkova, I.A. Latfullin, A.V. Aganov, V.V. Klochkov // *Journal of Molecular Structure* – 2016 – Vol. 1105, P. 25-29.
- A5. **Рахматуллин, И.З.** Динамическое ЯМР исследование семичленных производных пиридоксина / И.З. Рахматуллин, Л.Ф. Галиуллина, М.Р. Гарипов, А.Д. Стрельник, Ю.Г. Штырлин, В.В. Клочков //

- Международный симпозиум «Биохимия – основа наук о жизни», посвященного 150-летию образования кафедры биохимии Казанского университета: Сборник трудов – Казань, КФУ – 2013 – С. 118-119.
- A6. **Рахматуллин, И.З.** Исследование циклических производных пиридоксина методом динамического ядерного магнитного резонанса / И.З. Рахматуллин, Л.Ф. Галиуллина, М.Р. Гарипов, А.Д. Стрельник, Ю.Г. Штырлин, В.В. Клочков // Республиканский конкурс научных работ среди обучающихся на соискание премии им. Н.И. Лобачевского: Сборник материалов – Казань, КФУ – 2014 – С. 343.
- A7. **Рахматуллин, И.З.** Исследование циклических производных пиридоксина методом динамического ядерного магнитного резонанса / И.З. Рахматуллин, Л.Ф. Галиуллина, М.Р. Гарипов, А.Д. Стрельник, Ю.Г. Штырлин, В.В. Клочков // XXI Всероссийская конференция «Структура и динамика молекулярных систем»: Сборник тезисов – Йошкар-Ола – 2014 – С. 129.
- A8. **Rakhmatullin, I.Z.** Complex formation between pravastatin and sodium dodecyl sulfate micelle studied by NMR spectroscopy / I.Z. Rakhmatullin, L.F. Galiullina, E.A. Klochkova, A.V. Aganov, V.V. Klochkov // XVII International Youth Scientific School «Actual problems of magnetic resonance and its application»: Program. Lecture Notes. Proceedings – Kazan – 2014 – P. 106.
- A9. **Рахматуллин, И.З.** Исследование конформационной структуры статинов и производных пиридоксина методами ЯМР спектроскопии / И.З. Рахматуллин, Л.Ф. Галиуллина, Э.А. Ключкова, М.Р. Гарипов, А.Д. Стрельник, Ю.Г. Штырлин, А.В. Аганов, В.В. Клочков // 11-ая Зимняя молодежная школа-конференция Spinus «Магнитный резонанс и его приложения»: Материалы конференции – Санкт-Петербург – 2014 – С. 90-92.
- A10. **Рахматуллин, И.З.** Исследование пространственного строения статинов методами ЯМР спектроскопии [Текст] / И.З. Рахматуллин, Л.Ф. Галиуллина, Э.А. Ключкова, А.В. Аганов, В.В. Клочков // Итоговая конференция Казанского (Приволжского) федерального университета – Казань – 2015.
- A11. Галиуллина, Л.Ф. Исследование пространственной структуры лекарственных средств, а также их комплексов с модельными мембранами в растворе методами ЯМР спектроскопии / Л.Ф. Галиуллина, **И.З. Рахматуллин**, О.В. Аганова, А.В. Аганов, В.В. Клочков // VI Всероссийская конференция «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях»: Сборник тезисов – Казань – 2015 – С. 40-41.
- A12. **Рахматуллин, И.З.** Исследование пространственного строения производных пиридоксина методами ЯМР спектроскопии / И.З. Рахматуллин, Л.Ф. Галиуллина, М.Р. Гарипов, А.Д. Стрельник, Ю.Г. Штырлин, В.В. Клочков // VI Всероссийская конференция «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях»: Сборник тезисов – Казань – 2015 – С. 160-161.

